

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum* cultivado en placa

PRESENTADO POR:

BACH. SHEILA MILAGROS ALCANTARA SAGASTEGUI

BACH. EYMAR ENRIQUE CORREA VALVERDE

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

**NUEVO CHIMBOTE –PERU
2018**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum* cultivado en placa

PRESENTADO POR:

BACH. SHEILA MILAGROS ALCANTARA SAGASTEGUI

BACH. EYMAR ENRIQUE CORREA VALVERDE

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y Aprobado por el Asesor

Blgo. Mblgo. JOSÉ MANUEL VILLANUEVA CARLOS
ASESOR

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Efecto de la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum* cultivado en placa

TESISTAS:

BACH. SHEILA MILAGROS ALCANTARA SAGASTEGUI
BACH. EYMAR ENRRIQUE CORREA VALVERDE

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNÓLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS
SEÑORES MIEMBROS

M. Sc. ÁNGEL CASTRO ALVARADO
PRESIDENTE

Mblgo. JOSÉ VILLANUEVA CARLOS
SECRETARIO

Mblgo. ETERIO ALVA MUÑOZ
INTEGRANTE

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Aula de ciencias C-2, siendo las 11:30 horas del día 14 de setiembre del 2018, dando cumplimiento a la Resolución N° 205-2018-UNS-FC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por Ms. C Angel Castro Alvarado, teniendo como miembros a Blgo Mblgo José M. Villanueva Carlos (secretario) (a), y Blgo Mblgo Eterio Alva Muñoz (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de licenciado en Biotecnología realizado por el, (la), (los) tesista (as) Sheila Milagros Alantara Sagastegui y Eymar Enrique Correa Valverde

....., quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada: Efecto de la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum* cultivado en placa

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como sobresaliente asignándole un calificativo de Diecinueve (19) puntos, según artículo 103° del Reglamento General de Grados y Titulos de la Universidad Nacional del Santa, vigente (Resolución N° 492-2017-CU.-R-UNS)

Siendo las 12:30 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

Nombre: Ms. C Angel Castro Alvarado
Presidente

Nombre: Blgo Mblgo José Villanueva Carlos
Secretario

Nombre: Blgo Mblgo. Eterio Alva Muñoz
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesistas () y archivo (02).



DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo de investigación a Dios y a nuestros padres. A Dios porque ha estado con nosotros a cada paso que damos, cuidándonos y dándonos fortaleza para continuar, a nuestros padres, quienes a lo largo de nuestras vidas han velado por nuestro bienestar y educación siendo nuestro apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se nos presentaba sin dudar ni un solo momento en nuestra inteligencia y capacidad. Es por ellos que somos lo que somos ahora.

AGRADECIMIENTO

La presente tesis es un esfuerzo en el cual, directa e indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndonos paciencia, dándonos ánimo, acompañándonos en nuestros momentos de crisis y nuestros momentos de felicidad.

A nuestro asesor, Mblgo. José Villanueva Carlos, M. Sc. Ángel Castro Alvarado, Mblgo. Eterio Alva Muñoz, Dr. Roberto Vega Paulino, M. Sc. Willian Capa Robles y Dr. Carlos Azañero Díaz por compartir su enorme experiencia con sus comentarios y consejos hacia el trabajo.

Agradecemos también al Sr. Oscar Chauca Quintana por la paciencia, asistencia técnica y apoyo brindado en la ejecución de este trabajo de investigación.

A nuestros profesores de la carrera profesional por su aporte a nuestra formación, por consejos, enseñanzas, apoyo y por su amistad.

Les agradecemos también a nuestros padres los cuales nos brindaron su apoyo incondicional en cada paso y decisión que tomamos, a nuestros hermanos que siempre nos animaron a seguir siempre.

Gracias a todos

RESUMEN

Se utilizó bagazo de caña de azúcar proveniente de la Agroindustria San Jacinto S.A.A (ubicado en el valle del río Nepeña, en la región Áncash) pretratado por *Pleurotus ostreatus* como sustrato para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum*.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum* cultivado en placa. Para esto, el bagazo se sometió a un pretratamiento biológico correspondiente a cuatro temperaturas experimentales: 26°C, 28°C, 30°C y 32°C por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida y un experimento control. Posteriormente, se recuperó el bagazo y se usó como fuente de carbono para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum* cultivado en placa. Los resultados indicaron que a partir del bagazo pretratado biológicamente a 30°C se sintetizaron celulasas con mayor actividades enzimáticas y específicas ($p < 0.05$).

Palabras Claves: Celulasas, celulosa, *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum*.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse from the San Jacinto Agro-industry S.A.A (located in the Nepeña river valley, in the Ancash region) pretreated by *Pleurotus ostreatus* was used as substrate for cellulases synthesis by *Trichoderma harzianum*.

The objective of this research was to evaluate the effect of temperature in the biological pretreatment of sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum*) by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation for cellulases synthesis by *Trichoderma harzianum*. For this, the bagasse was subjected to a biological pretreatment corresponding to four experimental temperatures: 26 ° C, 28 ° C, 30 ° C and 32 ° C by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation and a control experiment. Subsequently, the bagasse was recovered and used as a carbon source for cellulases synthesis by *Trichoderma harzianum* grown on plate. The results indicated that cellulases with greater enzymatic and specific activities were synthesized from biologically pretreated bagasse at 30°C (p <0.05).

Key words: Cellulases, cellulose, *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum*

ÍNDICE

| | Pág. |
|---|------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTO | ii |
| RESUMEN | iii |
| ABSTRACT | iv |
| ÍNDICE | v |
| ÍNDICE DE CUADROS | viii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 2.1 Caña de azúcar | 4 |
| 2.2 Producción de la caña de azúcar | 4 |
| 2.3 Residuos generados por la industria azucarera | 4 |
| 2.4 Biomasa lignocelulósica | 5 |
| 2.4.1 Usos del bagazo de caña de azúcar | 5 |
| 2.4.2 Composición del bagazo de caña de azúcar | 5 |
| 2.4.2.1 Celulosa | 6 |
| 2.4.2.2 Hemicelulosa | 7 |
| 2.4.2.3 Lignina | 7 |
| 2.5 Pretratamiento del bagazo de caña de azúcar | 8 |
| 2.5.1 <i>Pleurotus ostreatus</i> | 8 |
| 2.6. Microorganismos celulolíticos | 9 |
| 2.6.1 <i>Trichoderma harzianum</i> | 10 |
| 2.7 Celulasas | 10 |
| 2.8 Fermentación | 11 |
| 2.8.1 Fermentación en estado líquido | 11 |
| 2.8.2 Fermentación en estado sólido | 11 |

| | |
|--|-----|
| 2.9 Cuantificación proteica | 12 |
| 2.9.1 Método de Bradford | 12 |
| 2.9.2 Método de Lowry | 12 |
| 2.10 Parámetros enzimáticos | 13 |
| 2.10.1 Actividad enzimática | 13 |
| 2.10.2 Actividad específica | 13 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 3.1 Materiales | 14 |
| 3.1.1 Biológico | 14 |
| 3.1.2 No Biológico | 14 |
| 3.2 Acondicionamiento del bagazo de caña de azúcar | 15 |
| 3.3 Preparación del antibiótico | 15 |
| 3.4 Preparación del inóculo de <i>Pleurotus ostreatus</i> | 15 |
| 3.5 Pretratamiento biológico | 16 |
| 3.6 Separación del bagazo pretratado | 18 |
| 3.7 Activación de <i>Trichoderma harzianum</i> | 18 |
| 3.8 Producción de celulasas | 19 |
| 3.9 Obtención del extracto enzimático | 20 |
| 3.10 Cuantificación de la fracción proteica del extracto enzimático | 21 |
| 3.11 Determinación de las actividades enzimáticas | 21 |
| 3.12 Determinación de las actividades específicas | 233 |
| 3.13 Análisis estadístico | 23 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 24 |
| 4.1 Cuantificación de la fracción proteica total del extracto enzimático | 24 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Determinación de las actividades enzimáticas de las enzimas lignocelulolíticas presentes en el extracto enzimático | 27 |
| 4.3 Determinación de las actividades específicas de las enzimas lignocelulolíticas presentes en el extracto enzimático | 30 |
| V. CONCLUSIONES | 33 |
| VI. RECOMENDACIONES | 33 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Pág. |
|--|------|
| Cuadro 1. Producción de la caña de azúcar en el Perú. | 4 |
| Cuadro 2. Composición completa del bagazo de caña de azúcar. | 5 |
| Cuadro 3. Métodos de pretratamiento del bagazo de caña de azúcar. | 8 |
| Cuadro 4. Medio M7GY. | 16 |
| Cuadro 5. Composición del medio para el pretratamiento biológico. | 17 |
| Cuadro 6. Diseño experimental. | 17 |
| Cuadro 7. Medio de producción de celulasas. | 19 |
| Cuadro 8. Actividades enzimáticas de las principales enzimas celulasas y lignocelulasas totales presentes en el extracto enzimático. | 28 |
| Cuadro 9. Actividades específicas de las principales enzimas celulasas y lignocelulasas totales presentes en el extracto enzimático. | 31 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Estructura química de la celulosa. | 6 |
| Figura 2. Estructura de la celulosa en su forma natural. | 6 |
| Figura 3. Modelo de la interacción de los componentes de la pared celular vegetal. | 7 |
| Figura 4. Reacción catalítica de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa. | 9 |
| Figura 5. Hidrólisis de la celulosa. | 11 |
| Figura 6 . Cepas fúngicas. | 14 |
| Figura 7. Bagazo de caña de azúcar. | 14 |
| Figura 8. Acondicionamiento del bagazo de caña de azúcar. | 15 |
| Figura 9. Preparación de gentamicina 0.04 g/L. | 15 |
| Figura 10. Preparación del inóculo de <i>Pleurotus ostreatus</i> . | 16 |
| Figura 11. Pretratamiento biológico por <i>Pleurotus ostreatus</i> . | 17 |
| Figura 12. Bagazo de caña de azúcar pretratado. | 18 |
| Figura 13. Activación de <i>Trichoderma harzianum</i> . | 18 |
| Figura 14. Síntesis de celulasas por <i>Trichoderma. harzianum</i> cultivado en placa. | 20 |
| Figura 15. Obtención del extracto enzimático. | 20 |
| Figura 16. Método Bradford. | 21 |
| Figura 17. Prueba de DNS. | 22 |
| Figura 18. Cuantificación de la fracción proteica del secretoma de <i>T. harzianum</i> cultivado sobre bagazo de caña de azúcar. | 24 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|-------------|
| ANEXO 1: Reactivos | 44 |
| 1.1. Buffer citrato 0,05 M pH = 5,4 (para 1 L) | 44 |
| 1.2. Solución madre de glucosa al 0.2 % | 44 |
| ANEXO 2: Curvas de calibración (Protocolos) | 44 |
| 2.1. Curva de calibración de glucosa (Método de DNS) | 44 |
| 2.2. Curva de calibración de proteínas (BSA) | 45 |

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú aproximadamente 1,8 millones de toneladas de bagazo de caña de azúcar son producidas anualmente, este residuo agroindustrial es abundante y de muy bajo costo (Vilches, 2002). El bagazo de caña de azúcar está conformado principalmente de lignina, hemicelulosa y celulosa, la cual se encuentra rodeada por polisacáridos hemicelulósicos que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, haciéndola aún más resistente a la hidrólisis química y biológica (Lynd *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2011)

Las celulasas son un complejo multienzimático que consiste principalmente de tres enzimas (endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa), estas enzimas actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa hasta sus monómeros de glucosa (Pandey *et al.*, 2017). Las celulasas han experimentado un incremento en su demanda desde 1995 en varias aplicaciones industriales como: producción de azúcares fermentables, detergentes, biocombustibles y en la industria textil, alimentaria y papelería (Oliva, 2003; Bardales *et al.*, 2015; Pandey *et al.*, 2017). Debido a sus múltiples aplicaciones en los últimos años la investigación en hongos y microorganismos con la capacidad de degradar compuestos lignocelulósicos se ha incrementado exponencialmente (Cohen *et al.*, 2002)

Se considera que desarrollar un proceso de producción de celulasas es difícil por el alto costo del sustrato (celulosa pura) y algunos químicos que se utilizan (Sharada *et al.*, 2013). Según Nagoor *et al.* (2015) el pretratamiento en materiales lignocelulósicos (bagazo de caña de azúcar) aumenta los rendimientos en la hidrólisis de la celulosa del 20 al 90%.

Los tratamientos biológicos son procesos amigables con el ambiente en los cuales se degrada de forma aerobia principalmente la lignina (Hatakka, 1983). La fermentación en sustrato sólido ofrece diferentes ventajas: fácil recuperación del producto, alta productividad volumétrica, aprovechamiento de numerosos desperdicios agroindustriales, menor generación de efluentes y residuos (Yang & Yuan, 1990; Nigam & Singh, 1994; Robinson & Nigam, 2003; Couto & Sanromán, 2006; Thomas *et al.*, 2013; Hansen *et al.*, 2015).

Pleurotus ostreatus es un hongo de pudrición blanca que crece de forma natural en árboles aliso, balsa y arce, principalmente en valles y ríos (Stamets,2000). Posee características como: selectividad al degradar la lignina y hemicelulosa, capacidad de crecer fácilmente en desechos agroindustriales (Cohen *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2008). Aunque se han desarrollado diversos estudios para establecer los parámetros óptimos en el proceso de deslignificación de residuos lignocelulósicos por *P. ostreatus* dentro de los cuales se evaluaron el efecto del pH, factores nutricionales e importancia del cobre y cadmio en su actividad enzimática (Baldrian & Gabel, 2002; Hou *et al.*, 2004). Aún no se ha estudiado el efecto del comportamiento degradativo de *P. ostreatus* como pretratamiento biológico sobre el bagazo de caña de azúcar a diferentes temperaturas en fermentación sumergida como sustrato para su consecuente uso en la síntesis de celulasas (Guillén *et al.*, 1998).

Dentro de las investigaciones más resaltantes sobre la utilización de bagazo de caña de azúcar como sustrato para la producción de celulasas por *Trichoderma harzianum* está la ejecutada por Benoliel *et al.* (2013) quienes utilizaron bagazo deslignificado a través de pretratamiento ácido y alcalino para la producción de celulasas en el cual comprobaron su uso potencial para la síntesis de estas enzimas.

Por lo antes mencionado, en este trabajo de investigación se utilizó bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) como fuente de carbono y dos hongos: *P. ostreatus* encargado del pretratamiento biológico y *T. harzianum* para la síntesis de celulasas.

El enunciado del problema del trabajo de investigación fue el siguiente: ¿Cuál es el efecto de la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum* cultivado en placa? y resolviéndolo con la siguiente hipótesis: Si cultivamos *Trichoderma harzianum* a 30°C con bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) pretratado biológicamente por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida a diferentes temperaturas (26°C, 28°C, 30°C y 32°C), entonces se sintetizará celulasas con mayor actividad enzimática y específica con el bagazo de caña de azúcar pretratado biológicamente a 30°C.

Considerando que nuestro país no está libre de la acumulación de los desechos lignocelulósicos generados anualmente por causa de las actividades agrícolas, forestales, industriales (maderas, papeleras, etc) y municipales; lo que constituye una constante contaminación ambiental. La hidrólisis enzimática mediante el uso de celulasas o microorganismos celulolíticos pueden ser una alternativa para convertir estos residuos en sustratos para usos biotecnológicos. Por este motivo, la presente tesis busca brindar una solución alternativa a esta problemática, utilizando este desecho agroindustrial como materia prima en un proceso de síntesis de celulasas. Las cuales están siendo utilizadas principalmente en la producción de bioetanol. Por lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta investigación fue evaluar el efecto de la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) por *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida para la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum* cultivado en placa. Así mismo, los objetivos específicos fueron los siguientes: Cuantificar el secretoma proteico, determinar las actividades enzimáticas y las actividades específicas producidas por *Trichoderma harzianum* a partir del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) pretratado biológicamente por *Pleurotus ostreatus*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una hierba perenne originaria de Asia, angiosperma, monocotiledónea, adaptada a zonas tropicales y sub tropicales (Andrade & Colodette, 2014).

2.2. Producción de la caña de azúcar

Los principales factores que influyen en el cultivo de caña de azúcar son: la composición genética, el clima, el manejo agronómico (Aucatoma *et al.*, 2015). La producción de caña de azúcar en el Perú (Cuadro 1), es favorecida principalmente por las condiciones óptimas de clima y suelo (MINAGRI, 2017).

Cuadro 1. Producción de la caña de azúcar en el Perú

| Año | Producción (T) | Superficie cosechada (ha) | Rendimiento (K/ha) |
|------|----------------|---------------------------|--------------------|
| 2010 | 9 660 895 | 76 983 | 125 494 |
| 2011 | 9 884 936 | 80 069 | 123 455 |
| 2012 | 10 368 866 | 81 126 | 127 812 |
| 2013 | 10 992 240 | 82 205 | 133 717 |
| 2014 | 11 389 617 | 90 357 | 126 051 |
| 2015 | 10 211 856 | 84 574 | 120 744 |
| 2016 | 9 832 526 | 87 696 | 112 120 |

FUENTE: MINAGRI (2017)

2.3. Residuos generados por la industria azucarera

Solo el 10% de la caña se convierte en azúcar, el resto se convierte en subproductos (Suárez, 2012). Entre los principales contaminantes generados por la industria azucarera están la melaza, vinaza, el bagazo de caña de azúcar, la cachaza, subproductos colaterales como los gases de combustión y las aguas residuales (Basanta *et al.*, 2007; Berman, 2011).

2.4. Biomasa lignocelulósica

2.4.1. Usos del bagazo de caña de azúcar

Dentro de lo principales usos del bagazo de caña de azúcar tenemos: la producción de derivados de celulosa, tales como: nitrato de celulosa, acetato de celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa (CMC), producción de papel, industria textil y química entre otros (Festucci-Buselli *et al.*, 2007; Andrade & Colodette, 2014; Becerra *et al.*, 2016). Además, se ha estudiado su uso como fuente para la producción de electricidad (combustible en las industrias azucarera) y como importante fuente de alimento de ganado (Martínez *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2010; Berman, 2011).

2.4.2. Composición del bagazo de caña de azúcar

Según Maeda *et al.* (2011), el bagazo de caña de azúcar está formado principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Cuadro 2). La hemicelulosa enlaza la celulosa y lignina creando la matriz del complejo lignocelulósico (Margarita *et al.*, 2015). El bagazo de caña de azúcar constituye un sustrato rico para el desarrollo de microorganismos y en él ocurren varias reacciones simultáneas dando lugar a la generación de calor (Aguilar-Rivera, 2011).

Cuadro 2. Composición completa del bagazo de caña de azúcar

| Componentes | Caña de azúcar (%) |
|--------------|--------------------|
| Celulosa | 35 |
| Hemicelulosa | 31 |
| Lignina | 20 |
| Ceniza | 9 |
| Humedad | 5 |
| Total | 100 |

FUENTE: Maeda *et al.* (2011)

2.4.2.1. Celulosa

La celulosa es el polímero biológico más abundante en la tierra, posee alto peso molecular, es lineal y está compuesto por largas cadenas de moléculas de D- glucosa unidas por enlaces β -1,4 (Klemm *et al.*, 1998; Carreño *et al.*, 2012). Ver (Fig. 1). Es sintetizada a partir de la UDP-glucosa mediante la enzima celulosa sintasa (CESA) uniendo residuos de glucosa mediante enlaces β (1-4) D-glucopiranosil (Delmer & Haigler, 2002, Festucci-Buselli *et al.*, 2007). La celobiosa es la unidad estructural repetitiva de la celulosa, este dímero está formado por dos residuos de glucosa unidos mediante enlaces β (1-4) D-glucopiransil (Kudlicka & Brown, 1996). En estado natural, la celulosa está compuesta de regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas, las regiones cristalinas son altamente ordenadas y más resistente a la hidrólisis enzimática; mientras que las regiones amorfas son poco ordenadas y más sensibles a la degradación (Heldt, 1997). Como se muestra en la Fig. 2.

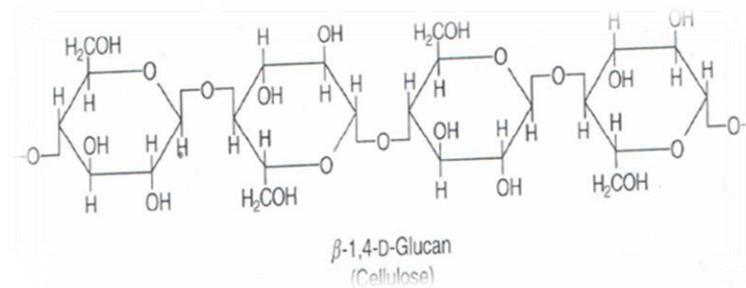


Figura 1. Estructura química de la celulosa (Heldt, 1997).

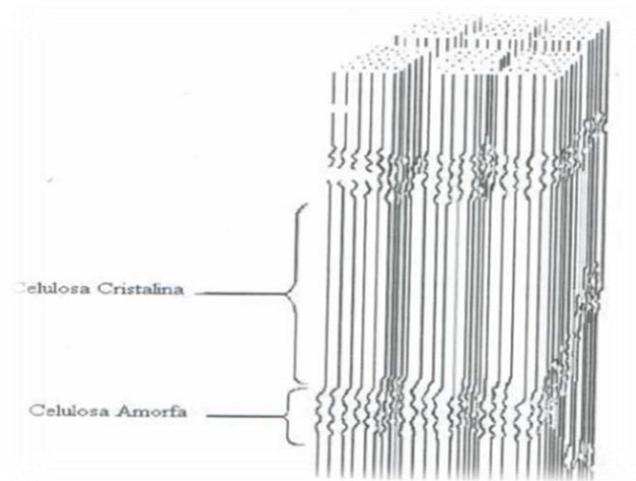


Figura 2. Estructura de la celulosa en su forma natural (Heldt, 1997).

2.4.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa, está compuesta de polímeros de pentosas, hexosas y compuestos fenólicos que forman cadenas de 100 a 200 unidades (Bayer *et al.*, 1998; Howard *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2008). Es más fácilmente hidrolizable que la celulosa debido a su estructura predominantemente amorfa y altamente ramificada (Saha, 2003; Guarnizo *et al.*, 2009). Martínez *et al.* (2008) mencionaron que las moléculas de hemicelulosa se encuentran altamente entrecruzadas mediante puentes diferúlicos formando una red en la que se encuentran embebidas las microfibrillas de celulosa (Fig. 3).

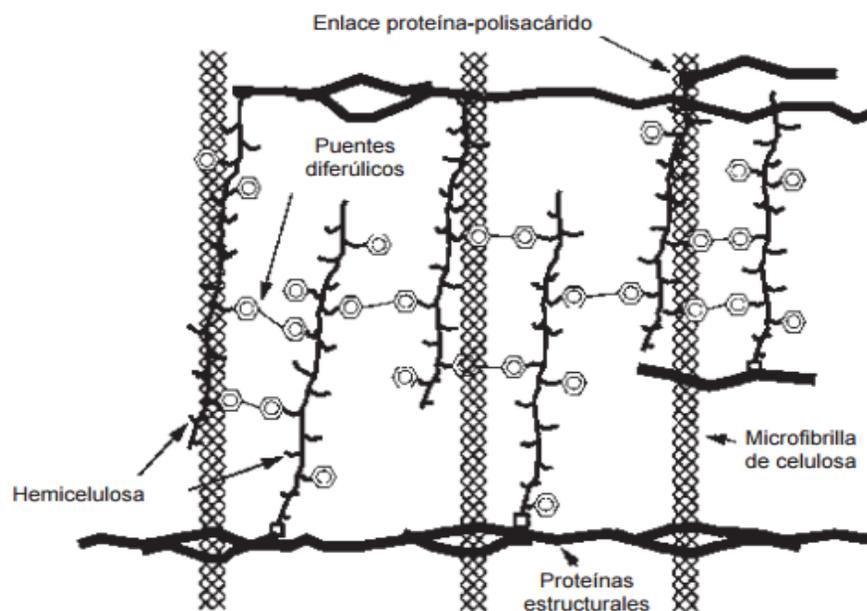


Figura 3. Modelo de la interacción de los componentes de la pared celular vegetal. Martínez *et al.* (2008).

2.4.2.3. Lignina

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en la pared celular de las plantas y es considerada como un recurso renovable, asequible y de potencial uso industrial (Kang *et al.*, 2012; Chávez & Domine, 2013). Compone entre el 20% - 25% de las paredes celulares de las plantas (Ikeda *et al.*, 2002). Se encuentra unida covalentemente a las hemicelulosas y a la celulosa, formando el complejo lignina-hidrato de carbono. (Barnett & Jeronimidis, 2003; de la Macorra, 2004).

2.5. Pretratamiento del bagazo de caña de azúcar

El pretratamiento de los materiales lignocelulósicos por diversos métodos (Cuadro 3) es una etapa muy importante para mejorar el fraccionamiento de la celulosa, ya que su objetivo es eliminar la lignina y hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar la porosidad de los materiales. Sin embargo, se debe evitar la degradación o pérdida de carbohidratos o formación de subproductos inhibitorios para las enzimas y microorganismos en los procesos de hidrólisis y fermentación (Viñals-Verde *et al.*, 2012).

Cuadro 3. Métodos de pretratamiento del bagazo de caña de azúcar.

| Métodos de pretratamiento | Cambios en la biomasa | Características |
|---------------------------|--|---|
| Pretratamiento físico | No modifican la estructura química de la materia prima, aumentan el área superficial y el tamaño de poro | Alto consumo energético. |
| Pretratamiento químico | solubiliza la hemicelulosa y la lignina con el fin de exponer la celulosa | Producen sustancias nocivas y además requirieren equipos de material especial que no sean susceptibles a daños causados por el bajo pH. |
| Pretratamiento biológico | Degradan en forma aeróbica, la lignina. | Procesos ecológicos y no hay generación de inhibidores, es llevado a cabo por la acción de microorganismos como los hongos o enzimas. |

FUENTE: Cadoche & López (1989), Fonseca *et al.* (2006), del Prado (2009), Taherzadeh & Karimi (2008), Guarnizo *et al.* (2009), Chen *et al.* (2010), Sindhu *et al.* (2015)

2.5.1. *Pleurotus ostreatus*

P. ostreatus es capaz de crecer en residuos agroindustriales y surge como una alternativa para el manejo de desechos agrícolas lignocelulósicos (Aline *et al.*, 2015). La principal característica de *Pleurotus* es su selectividad para degradar lignina y hemicelulosa (Cohen *et al.*, 2002; Wing & Alvarado, 2009). También, es capaz de crecer bien en residuos con una alta relación carbono / nitrógeno y a una temperatura entre 25°C-30°C (Zhang *et al.*, 1995; Aline *et al.*, 2015). Se ha determinado que para la degradación de la lignina en este hongo interviene un sistema enzimático que consta de las enzimas manganeso peroxidasa (MnP), lacasa y lignina peroxidasa (Ramos, 1999). Según Díaz (2009), para la despolimerización de la lignina existen dos rutas; la primera realizada por

la lignina peroxidasa y la segunda realizada por la manganeso peroxidasa. Como se muestra en la Fig. 4.

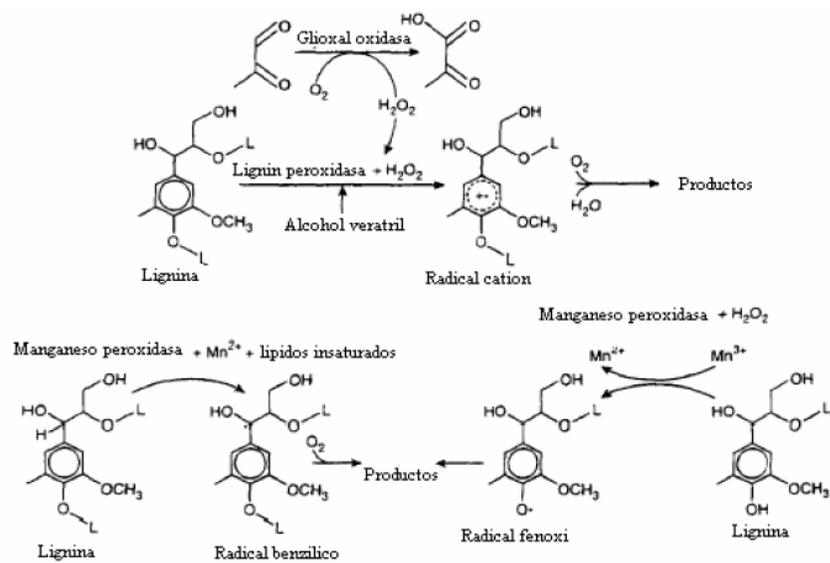


Figura 4. Reacción catalítica de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa (Díaz, 2009).

2.6. Microorganismos celulolíticos

En las dos últimas décadas, la fermentación en estado sólido (SSF) ha atraído la atención debido a las ventajas biotecnológicas que presenta, tales como: mayor capacidad de fermentación, mayor estabilidad del producto final, menor represión catabólica y tecnología rentable (Singhania *et al.*, 2010; El-Bakry *et al.*, 2015). La mayoría de los microorganismos empleados en la producción de celulasas en SSF son hongos, bacterias y en menor medida actinomicetos (Behera & Ray, 2016).

La producción de celulasas a partir de hongos es ventajosa en comparación con otros microorganismos, debido a que velocidad de producción de enzimas es mayor (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2011). Dentro de estos, uno de los grupos más activos y eficientes son los hongos filamentosos, los hongos celulolíticos comúnmente estudiados incluyen *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Rana & Kaur, 2012; Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2014).

2.6.1. *Trichoderma harzianum*

T. harzianum es un hongo filamentoso que habita en suelos donde los nutrientes de fácil asimilación son escasos y es alta la competencia con otros organismos, prefiere un pH ácido de 4.5-5, posee una gama extraordinaria de enzimas hidrolíticas (β -1,3- glucanasas, proteasas y celulasas) y quitinolíticas, también se desarrollan en áreas con un contenido de humedad no mayor al 60% (Ezziyyani & Sánchez, 2004; Romero-Arenas *et al.*, 2009; Gato, 2010; Martínez *et. al.*, 2013).

2.7. Celulasas

Las celulasas han experimentado un incremento en su demanda desde 1995, sus principales aplicaciones industriales son: detergentes, industria textil, alimentación animal e industria alimentaria, industria papelera e industria de los biocombustibles (Pandey *et al.*, 2017).

Las celulasas son un complejo multienzimático que posee principalmente tres componentes diferentes, endo-1,4-b-D-glucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa / exo-celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) y b-glucosidasa (EC 3.2.1.21). Estas tres enzimas actúan sinérgicamente para

hidrolizar completamente el polímero de celulosa en sus monómeros de glucosa (Fig. 5). Primero, la endo-1,4-b-D-glucanasa actúa al azar, entre fibras de celulosa para generar extremos reductores y no reductores, que son atacados además por exo-celobiohidrolasa, liberando celobiosa (dímeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4 glicosídicos). Finalmente, la celobiosa es hidrolizada por β -glucosidasa en monómeros de glucosa, el producto final (Pandey *et al.*, 2017).

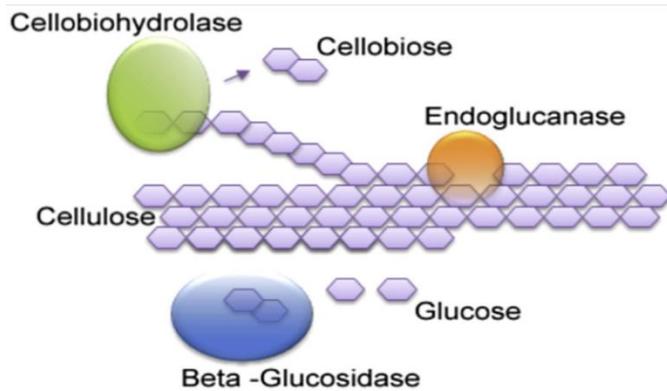


Figura 5. Hidrólisis de la celulosa. (Pandey *et al.*, 2017).

2.8. Fermentación

2.8.1. Fermentación sumergida

La fermentación sumergida es un sistema homogéneo que utiliza sustratos líquidos que fluyen libremente, se utiliza principalmente en la producción de metabolitos secundarios (Subramaniyam & Vimala, 2012). Generalmente es más rápida, los parámetros físicos y químicos son fáciles de controlar. Sin embargo, la purificación de productos no es fácil (Tunga *et al.*, 1998; Viniestra-González *et al.*, 2003; Subramaniyam & Vimala, 2012).

2.8.2. Fermentación en sustrato sólido

La fermentación en estado sólido (SSF por sus siglas en inglés) es un proceso de fermentación sobre un soporte sólido, dentro de sus principales ventajas se destacan la alta productividad volumétrica, menor producción de efluentes y residuos, la capacidad de aprovechamiento de numerosos desperdicios agroindustriales, menores costos de energía en los procesos (Yang & Yuan, 1990; Nigam & Singh, 1994; Robinson & Nigam, 2003; Couto & Sanromán, 2006; Thomas *et al.*, 2013). Sin embargo, la principal desventaja se relaciona con la dificultad en el control de parámetros de la fermentación, como el pH, temperatura, humedad, además de su transferencia de masa y energía que dificultan a aplicación a gran escala (Hamidi-Esfahani *et al.*, 2004).

2.9. Cuantificación proteica

2.9.1. Método de Bradford

El uso de este método, se basa en la adsorción de la proteína al azul brillante de Coomassie G-250, lo que provoca un cambio en el espectro de absorción visible del colorante, la intensidad de color del compuesto formado será proporcional a la concentración proteica de la muestra leída a 595 nm (Bradford, 1976; López-Belmonte, 1996).

2.9.2. Método de Lowry

Es un método espectrofotométrico que cuantifica las proteínas basándose en la utilización del reactivo de Folin-Ciocalteu, empleado generalmente para detectar grupos fenólicos, es más sensible que el de Biuret y es útil para la detección de 10 p.tg y 100 ~g proteína/ml de muestra (Haza,1995).Fundamentalmente posee las siguientes reacciones: los iones Cu^{++} (aportados por el reactivo de cobre), en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos de Cu^{++} -proteína poseen un color azul claro y provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos de tirosina el reactivo de Folin-Ciocalteu el cual es reducido por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando al cobre como catalizador (Lowry *et al.*, 1951; Betta,2014).

2.10. Parámetros enzimáticos

2.10.1. Actividad enzimática

Se define la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por min en condiciones estandarizadas de T, pH y [S] óptimo (Dutta, 2008). Generalmente la actividad enzimática se mide como la variación que presenta con el tiempo alguna de las concentraciones o propiedades del sustrato o del producto referidas a la cantidad de enzima utilizado (Ibarz *et al.*, 2000).

2.10.2. Actividad específica

Se define la actividad específica de una preparación enzimática como el número de micromoles de producto formado por min por mg de proteína o por mg de enzima, si se tiene una preparación purificada, en condiciones óptimas de pH, temperatura, fuerza iónica y concentración saturante de sustrato o sustratos (de Arriaga *et al.*, 1978). Puede realizarse sin haber conseguido la purificación completa, pero este valor va aumentando a medida que se va eliminando proteínas contaminantes (Devlin, 2004)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Escuela Académico Profesional de Biotecnología en la Universidad Nacional del Santa. Localizada en el distrito de Nuevo Chimbote, Provincia del Santa. Región Ancash, Perú.

3.1. Materiales

3.1.1. Biológico

Las cepas fúngicas (Fig. 6) que se utilizaron en este proyecto fueron donadas por el “Laboratorio de Biotecnología del Proyecto Especial CHAVIMOCHIC” y por el “FUNDO MI LESLIE S.A. – Casma”.

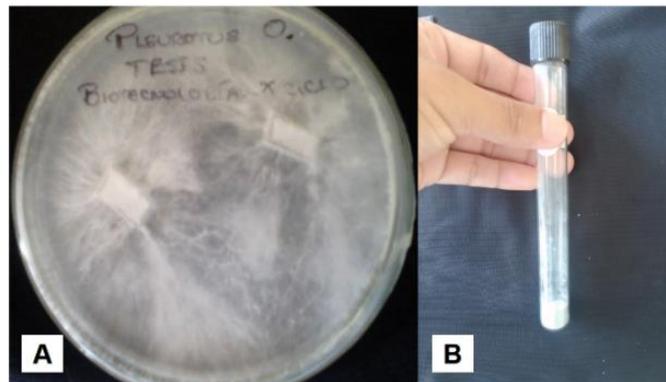


Figura 6 . Cepas fúngicas. A. *Pleurotus ostreatus* (Donado por el Proyecto Especial CHAVIMOCHIC); B. *Trichoderma harzianum* (Donado por FUNDO MI LESLIE S.A. – Casma)

3.1.2. No Biológico

El bagazo de Caña de Azúcar: Donado por la empresa Agroindustrias San Jacinto S.A.A (Fig. 7).



Figura 7. Bagazo de caña de azúcar

3.2. Acondicionamiento del bagazo de caña de azúcar

El bagazo fue cernido, lavado con agua destilada y secado a 80°C por 24 horas (Fig. 8) (Rezende *et al.*, 2002).



Figura 8. Acondicionamiento del bagazo de caña de azúcar. A. Selección primaria; B. Cernido; C. Lavado con agua destilada; D. Secado en estufa.

3.3. Preparación del antibiótico

El antibiótico usado en los medios de cultivo fue gentamicina comercial de 20 mg/2 ml el cual se preparó a concentración de 0.04 g/L (Fig. 9) y se añadió asepticamente a los medios de cultivo a razón de 1 ml/L se según Herrero *et al.* (2004).



Figura 9. Preparación de gentamicina 0.04 g/L. A. Extracción de gentamicina de la solución madre; B. Vertido del antibiótico en la fiola; C. Aforado con agua destilada estéril; D. Gentamicina 0.04g/L.

3.4. Preparación del inóculo de *Pleurotus ostreatus*

Asépticamente se extrajo un trozo de micelio de *Pleurotus ostreatus* crecido en la superficie del agar papa dextrosa (PDA) y se transfirió en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual contenía 150 ml de medio M7GY (Cuadro 4) y se agregó el antibiótico. Posteriormente se incubó por 72 h con 150 rpm a 25 °C en oscuridad (Parenti *et al.*, 2013). Como se muestra en la Fig. 10.

Cuadro 4. Medio M7GY

| Reactivo | g/L |
|---|-----|
| Glucosa | 10 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ | 2 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 |
| KH_2PO_4 | 1 |
| KCl | 0.5 |
| Extracto de levadura | 1 |

FUENTE: Castanera *et al.* (2012)

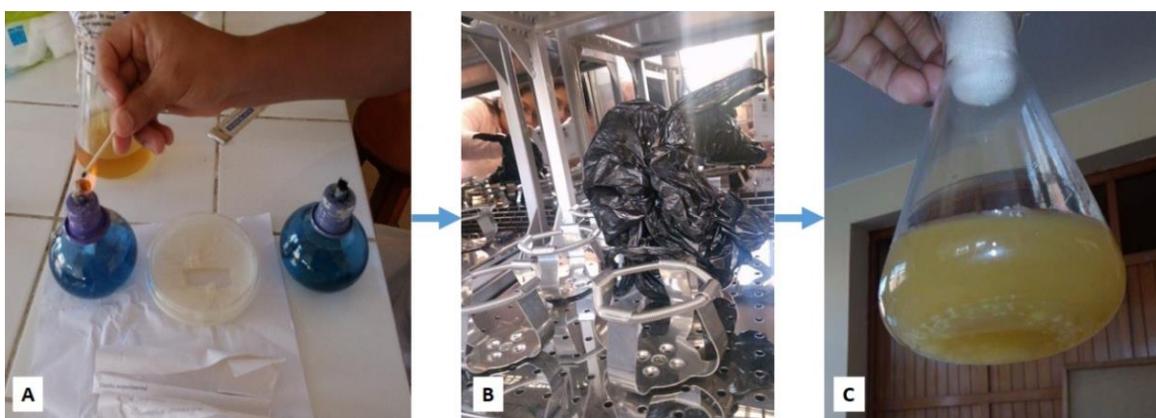


Figura 10. Preparación del inóculo de *Pleurotus ostreatus*. A. Extracción de micelio; B. Cultivo en oscuridad; C. Inóculo de *Pleurotus ostreatus*.

3.5. Pretratamiento biológico

El medio de pretratamiento biológico se preparó según Díaz (2009). Como se muestra en el Cuadro 5. Para esto, se preparó 45 mL del medio de pretratamiento biológico en un matraz Erlenmeyer de 250 mL al cual se le agregó 3 g de bagazo de caña de azúcar y se autoclavó. Luego, asépticamente se agregó antibiótico e inoculó 5 mL del inóculo de *P. ostreatus* (10^7 esporas/ml) y se incubó a las diferentes temperaturas experimentales (26°C, 28°C, 30°C y 32°C), con agitación constante de 150 rpm por 14 días en oscuridad (Fig. 11). Por otro lado, el tratamiento control consistió en 45 ml del medio para pretratamiento biológico, 5 ml de inóculo, antibiótico y fue mantenido en oscuridad a temperatura ambiente durante 14 días, el bagazo de caña de azúcar se agregó al finalizar los 14 días. Por tratamiento se realizó un experimento y tres repeticiones (Cuadro 6).



Figura 11. Pretratamiento biológico por *Pleurotus ostreatus*. A. Medio de pretratamiento suplementado con bagazo de caña de azúcar; B. Inoculación de *Pleurotus ostreatus*; C. Incubación en oscuridad y con agitación.

Cuadro 5. Composición del medio para el pretratamiento biológico

| Reactivo | g/L |
|------------------------------|------|
| Extracto de levadura | 5.0 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2.0 |
| K_2HPO_4 | 0.5 |
| MgSO_4 | 0.5 |
| $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 0.3 |
| FeSO_4 | 0.02 |
| ZnSO_4 | 0.02 |
| MnSO_4 | 0.02 |
| CuSO_4 | 0.25 |

* Bagazo de caña de azúcar 60 g/L como fuente de carbono

FUENTE: Díaz (2009)

Cuadro 6. Diseño experimental

| Componentes | Pretratamiento biológico | | | | |
|-------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | Control | 26°C | 28°C | 30°C | 32°C |
| Medio DL | 45 ml | 45 ml | 45 ml | 45 ml | 45 ml |
| Bagazo | 0 g | 3 g | 3 g | 3 g | 3 g |
| Antibiótico | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul | 50 ul |
| Inóculo | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml | 5 ml |
| Tiempo | 14 días | 14 días | 14 días | 14 días | 14 días |

3.6. Separación del bagazo pretratado

Al terminar la etapa de pretratamiento, el contenido de los 20 matraces se filtró, lavó con abundante agua destilada y se colocó en depósitos de papel aluminio (Fig. 12). Finalmente, el bagazo separado se secó en estufa a 80°C por 24 horas.

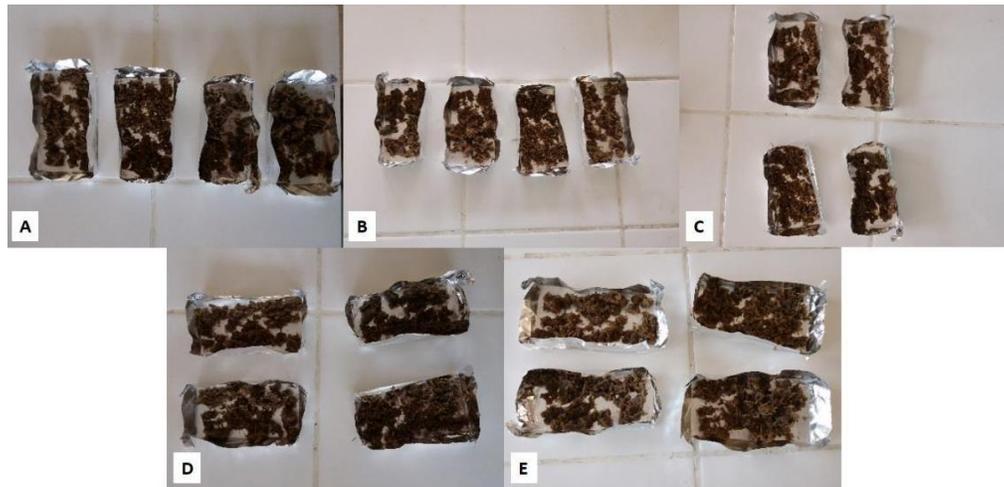


Figura 12. Bagazo de caña de azúcar pretratado. A. Bagazo control; B. Bagazo pretratado biológicamente a 26°C; C. Bagazo pretratado biológicamente a 28°C; D. Bagazo pretratado biológicamente a 30°C; E. Bagazo pretratado biológicamente a 32°C.

3.7. Activación de *Trichoderma harzianum*

La activación de *T. harzianum* el cual estuvo liofilizado se realizó por el método descrito por Cañedo & Ames (2004). Primero, se abrió el tubo de ensayo bajo un ambiente estéril, se extrajo una azada del hongo el cual se transfirió a un vial el cual contenía 1 ml de agua destilada estéril y se dejó reposar durante 30 min para la rehidratación (Fig. 13).



Figura 13. Activación de *Trichoderma harzianum*

3.8. Síntesis de celulasas

Por tratamiento se preparó 4 matraces con 15 mL de medio Mandels & Weber modificado, con una actividad de agua (aw) de 0.946, se ajustó a pH 5 con HCl 2 M y NaOH 2 M (Rocha *et al.*, 2016). Como se muestra en el Cuadro 7. Luego, se agregó 0.3 g de bagazo de caña de azúcar como única fuente de carbono. Después, los matraces se autoclavaron, luego los medios fueron mezclados con antibiótico y vertidos en placas. Posteriormente, se sembró 2 ul de la suspensión de *T. harzianum* en el centro de la placa. La producción de celulasas se realizó por 14 días a 30°C en oscuridad (Manjarrés *et al.*, 2011). Como se muestra en la Fig. 14.

Cuadro 7. Medio de síntesis de celulasas

| Reactivo | g/L |
|---|-------|
| Urea | 2.24 |
| Extracto de levadura | 1.14 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 3.42 |
| KH ₂ PO ₄ | 2 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.4 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.3 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,005 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 0.016 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0.014 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.002 |
| Agar | 20 |

* Bagazo de caña de azúcar pretratado biológicamente 20 g/L de como fuente de carbono

FUENTE: Rocha *et al.* (2016)



Figura 14. Síntesis de celulasas por *T. harzianum* cultivado en placa. A. Sembrado en placa de *T. harzianum* suplementado con bagazo pretratado; B. Síntesis de celulasas por *T. harzianum* en oscuridad a 30°C.

3.9. Obtención del extracto enzimático

Finalizado los 14 días de cultivo, se agregó 8 mL de Buffer citrato 0,05 M pH 5.4 en cada placa, luego se agitó vigorosamente por 15 min. Después, el extracto enzimático se vertió en tubos de ensayo, se centrifugó a 5000 rpm por 15 min (Paredes *et al.*, 2010), el sobrenadante se vertió en microtubos y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min (Flores *et al.*, 2015). Por último, el extracto enzimático se transfirió a microtubos de los cuales se extrajo las cantidades necesarias para las pruebas de cuantificación de la fracción proteica y la determinación de las actividades enzimáticas. Finalmente, el extracto enzimático restante fue conservado en microtubos a 4°C (Fig. 15).

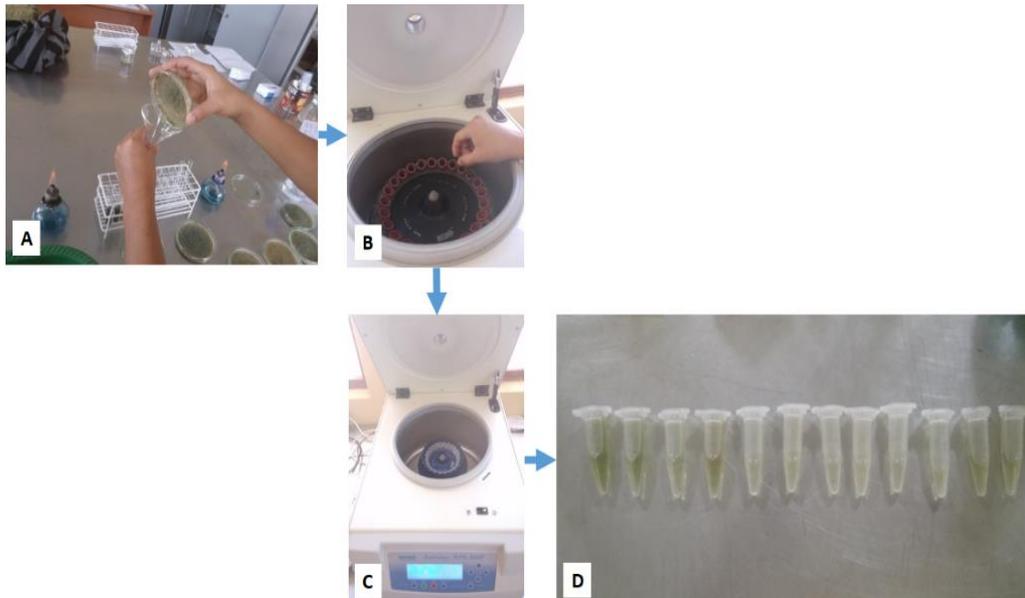


Figura 15. Obtención del extracto enzimático. A. Lavado de las placas con buffer; B. Centrifugación a 5000 rpm por 15 min; C. Centrifugación a 10000 rpm por 10 min; D. Extracto enzimático.

3.10. Cuantificación de la fracción proteica del extracto enzimático

La cuantificación de la fracción proteica del extracto enzimático se realizó según Bradford (1976). Primero, se extrajo 1 mL del reactivo de Bradford y vertió en un tubo de ensayo al cual se le agregó 0.1 mL del extracto enzimático, luego se homogenizó levemente y se dejó reaccionar por 10 min. Finalmente se midió la absorbancia a 595 nm (Fig. 16). El blanco usado contenía 1 mL del reactivo de Bradford y 0.1 mL de agua destilada. Las absorbancias obtenidas fueron insertadas en una curva estándar elaborada con albúmina de suero bovino (BSA) y finalmente convertidas en mg de proteína/mL.

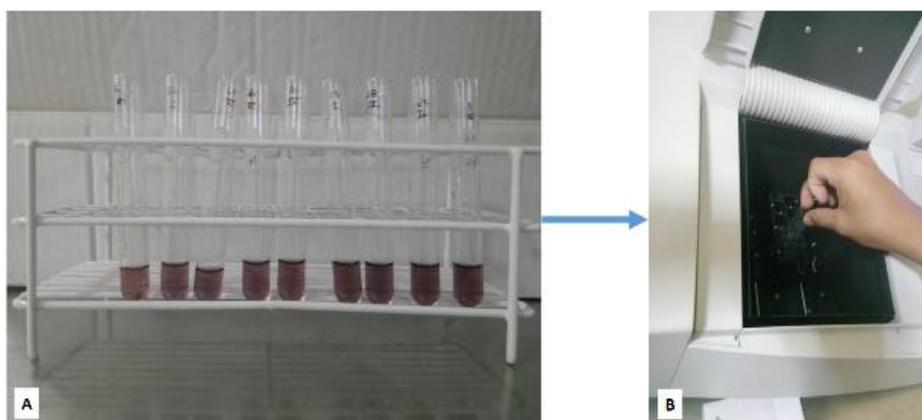


Figura 16. Método Bradford. A. Ensayos de Bradford; B. Lecturas espectrofotométricas a 595 nm.

3.11. Determinación de las actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas se evaluaron en sus respectivos sustratos. La actividad endoglucanasa se evaluó en carboximetilcelulosa (CMC), la actividad exoglucanasa en avicel, la actividad β -glucosidasa en celobiosa, la actividad celulasa total en papel filtro Whatmann N° 1 y la actividad lignocelulolítica total se evaluó en bagazo de caña de azúcar (Rocha *et al.*, 2016). Las actividades enzimáticas se determinaron a partir de la formación de producto, en estos casos a partir de la glucosa liberada, la cual se cuantificó mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) según Miller (1959). Para esto, el CMC, avicel y la celobiosa se prepararon al 2% p/v en buffer citrato 0.05 M pH 5.4 excepto el

papel filtro y el bagazo de caña de azúcar los cuales se prepararon al 5% p/v en buffer citrato 0.05 M pH 5.4 (Rocha *et al.*, 2016).

De cada extracto enzimático se determinó la actividad endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, celulasa total y lignocelulolítica total. Para determinar la actividad de cada enzima se extrajo 1 mL de su sustrato el cual se vertió en un tubo de ensayo, luego se agregó 0.5 mL del extracto enzimático, posteriormente se incubó a 50°C por 15 min los sustratos al 2% y por 1 h los sustratos al 5% (Eveleigh *et al.*, 2009). La inactivación enzimática se realizó sumergiendo el tubo de ensayo en agua helada por 2 min (Dutta, 2008). Enseguida, se agregó 1.5 ml de DNS a cada tubo, luego se puso a hervir por 5 min y después a enfriar en agua helada por 5 min. Posteriormente, se agregó 15 mL de agua destilada a cada tubo de ensayo y se homogenizó. Finalmente, se midieron las absorbancias a 540 nm (Fig. 17). Cabe mencionar que la muestra blanco contenía 1 mL de agua destilada, 0.5 mL de su propio extracto enzimático y 1.5 mL de DNS. Las absorbancias obtenidas fueron insertadas en una curva estándar elaborada y convertidas en mg de glucosa/mL.

La actividad enzimática se determinó según Dutta (2008).

$$\frac{U}{ml} = \frac{1.5 \text{ ml} \times \text{factor de dilución del extracto enzimático} \times \text{conc. de glucosa liberada en mg/ml}}{\text{minutos de ensayo} \times 0.180 \frac{\text{mg}}{\text{umol}} \times 0.5 \text{ ml}}$$

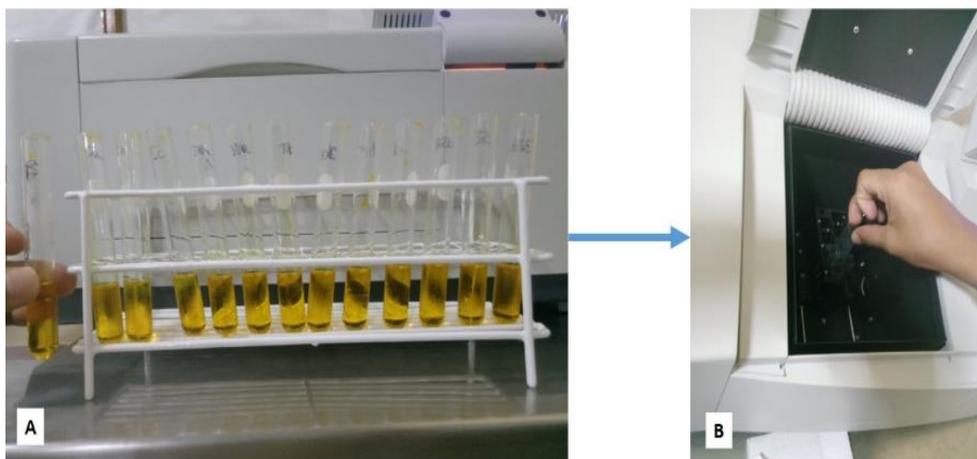


Figura 17. Prueba de DNS. A. Ensayos de DNS; B. Lecturas espectrofotométricas a 540 nm.

3.12. Determinación de las actividades específicas

La actividad específica de los extractos enzimáticos se calculó según, de Arriaga *et al.* (1978). Se dividió la actividad enzimática (U/ml) entre la concentración de proteínas totales presentes en el extracto enzimático (mg/ml). Y se reportó como U/mg.

3.13. Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados en IBM SPSS Statistics 23 con un ANOVA de una vía y un nivel de confianza del 95 %. Se utilizó la prueba Post Hoc - HSD de Tukey para determinar diferencias significativas entre las medias de grupo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Cuantificación de la fracción proteica total del extracto enzimático

La cuantificación de la fracción proteica del extracto enzimático obtenido a partir del bagazo de caña de azúcar control y del bagazo de caña de azúcar pretratado por *P. ostreatus* a diferentes temperaturas se observa en la Fig. 18.

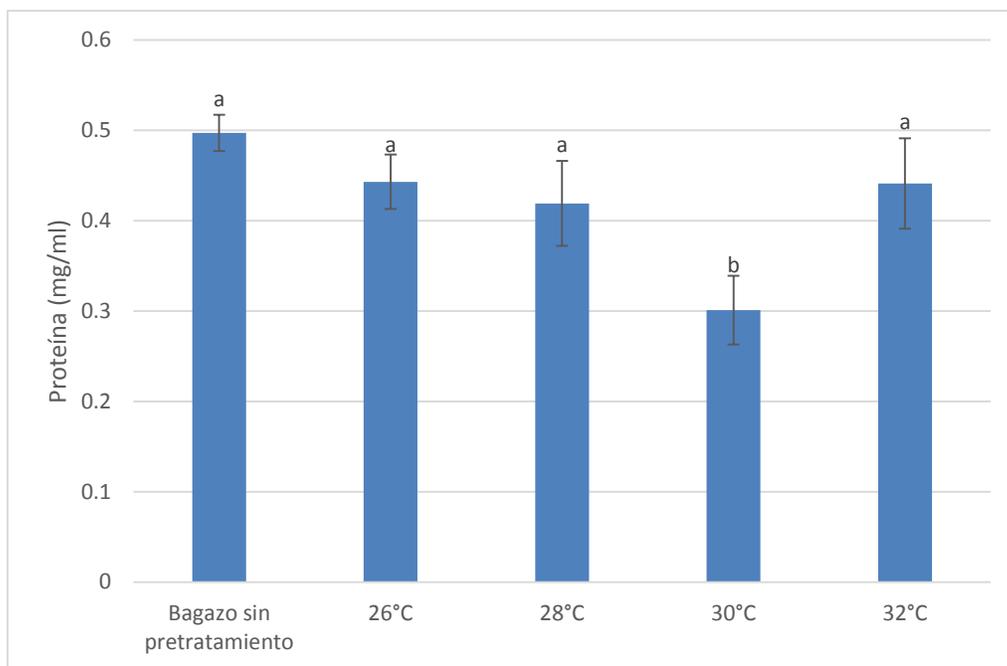


Figura 18. Cuantificación de la fracción proteica del secretoma de *T. harzianum* cultivado sobre bagazo de caña de azúcar. Las barras de error indican la desviación estándar. Las letras diferentes por encima de las barras indican diferencias significativas.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Esto indica que el someter o no al bagazo de caña de azúcar a un pretratamiento biológico, afecta directamente al secretoma de *T. harzianum* al usarse este como sustrato.

McCann & Carpita (2008), mencionaron que la celulosa está recubierta por hemicelulosa que consiste principalmente en xilano y glucomanano y que para la hidrólisis completa de estos polisacáridos se requieren diferentes enzimas como endoxilasas, xilosidasas y arabinosidasas para xilanos, así también, glucanasas y glucosidasas para glucomananos. Sin embargo, antes de acceder a la hemicelulosa se debe hidrolizar la lignina ya que es la

que la recubre, la despolimerización de lignina se logra por varias peroxidasas y lacasas (Aachmann *et al.*, 2012). Según Manavalan *et al.* (2014), los hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus* poseen enzimas lignolíticas (lacasas, manganeso peroxidasas y ligninoperoxidasas) y enzimas celulolíticas (endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas) las cuales son necesarias para la despolimerización de la lignocelulosa.

Rodríguez & Piñeros (2007), reportaron una superioridad significativa en la producción de celulasas a partir de racimos vacíos de palma de aceite como sustratos pretratados biológicamente por *Pleurotus ostreatus* a comparación de pretratamientos químicos con valores de 0,374 U/mL de celulasa total y 0,776 U/mL de endoglucanasa. Además, Li (2015), confirmó que el pretratamiento con *P. ostreatus* aumenta la susceptibilidad de la paja de arroz a la hidrólisis enzimática debido a la degradación parcial de la lignina, la cual es la responsable de prevenir la penetración de las celulasas en la celulosa.

La termoestabilidad es un factor importante en enzimas que se utilizan para la degradación de residuos agrícolas a nivel industrial (Muñoz, 2012). Cohen *et al.* (2002), describieron los sistemas lignolíticos de *P. ostreatus* sobre residuos agrícolas. Para *P. ostreatus* se han reportado hasta tres diferentes isoenzimas de MnP y lacasa (Becker & Sinitsyn, 1993). Sin embargo, se ha demostrado que para las isoenzimas de lacasas no se puede establecer una temperatura que garantice una óptima reacción ya que poseen una diferencia marcada en su termoestabilidad (Sarkar *et al.*, 1997). En otros estudios, Šnajdr & Baldrian (2007), mencionaron que las principales enzimas encargadas de la degradación de la lignina producidas por *P. ostreatus* son la manganeso peroxidasa y lacasa, las cuales se producen en el rango de 25°- 32 °C.

Se han realizado investigaciones para evaluar la temperatura óptima de producción y actividad de las enzimas encargadas de la degradación de la lignina en *Pleurotus ostreatus*, Patel *et al.* (2009) reportó que la mejor temperatura para la producción de lacasa es 28 °C. Sin embargo, Nadeem *et al.* (2014) reportó que a 30°C el hongo muestra el máximo crecimiento y producción de lacasa 5.62 ± 0.24 U/ml, además indica que la temperatura de 25 °C no favorece el crecimiento del hongo y subsecuentemente menor cantidad de lacasa

es producida. También se ha reportado que la temperatura óptima para la síntesis de lacasa y MnP es de 50 y 30°C respectivamente (Aslam & Asgher, 2011).

Por otro lado, reportes indican que la MnP producidas por *P. ostreatus* es susceptible a la desnaturalización por temperatura y que posee termoestabilidad a 30°C (Sutherland & Aust, 1996; Kamitsuji *et al.*, 2004). También se ha reportado que la temperatura óptima para la producción de manganeso peroxidasa y lacasa es de 30°C en el periodo de 14 días con una producción de lacasa de 4.4 ± 0.4 U/L y de 0.92 ± 0.15 U/L en manganeso peroxidasa, (Muñoz, 2012). Además, Liu *et al.* (2009) reportaron que las enzimas lacasas conservaron entre 90 y 100% de su actividad a 30°C. Son estas razones las que sustentan que la despolimerización significativa de lignina por *P. ostreatus* se alcanza en un cultivo en fase líquida a 30°C.

También existen evidencias que enzimas como la manganeso peroxidasa y lacasa de *P. ostreatus* pierden el 50% de actividad luego de 24 h de fermentación en estado líquido a 32°C (Šnajdr & Baldrian, 2007). Por otro lado, la temperatura óptima para el crecimiento de *P. ostreatus* es 28 °C, por lo que se la asocia a la etapa fructuración con una disminución significativa de la actividad lacasa seguido de un aumento de la actividad MnP (Atkinson & Mavituna, 1991; Widiastuti *et al.*, 2008).

La proteómica permite estudiar las proteínas expresadas por un organismo en un momento dado y bajo determinadas condiciones, por ejemplo Adav *et al.* (2012) caracterizó el secretoma de *T. reesei* cultivado con biomasa lignocelulósica como sustrato (fuente de carbono), en el cual identificaron y cuantificaron celulasas, amilasas, hemicelulasas, enzimas degradadoras de lignina, peptidasas, proteinasas, proteínas transportadoras y proteínas involucradas en la morfogénesis celular mediante la técnica de etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ). Así también, Silva *et al.* (2012), cultivaron *T. harzianum* en un medio con bagazo de caña de azúcar a partir del cual caracterizaron un complejo multienzimático el cual tenía actividad celulolítica y xilanolítica. Rocha *et al.* (2016), reportaron que cuando cultivaron *T. harzianum* a 30°C sobre bagazo de caña de azúcar deslignificado en el secretoma identificaron 117 proteínas

diferentes de las cuales el 71% fueron glucosidasas (principalmente enzimas que degradan celulosa y hemicelulasa) con una variedad de 26 familias.

Con los antecedentes mencionados se justifica que el secretoma de *T. harzianum* está en función al sustrato en el cual se cultiva, como se observó en la Fig. 18, donde a partir del bagazo pretratado biológicamente a 30°C se obtuvo menor concentración proteica, ya que se presume que solo se produjo un solo tipo de enzimas (celulasas) debido a la eficiente remoción de lignina por *P. ostreatus* en el pretratamiento biológico, por otro lado, a partir del bagazo de caña de azúcar en los cuales no se logró una buena remoción de la lignina y hemicelulosa se obtuvo mayor concentración proteica, esto posiblemente debido a la mayor variedad de proteínas secretadas (glucanasas, celulasas, hemicelulasas, peptidasas, xilanasas, lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa) debido la complejidad del sustrato. Wise (1990), reportó que el extracto de levadura puede ser una fuente de carbono para la biodegradación, por lo que puede inducir un efecto positivo para los hongos. También se ha reportado que el extracto de levadura puede ser utilizado como fuente de carbono para *Pseudomona sp.* y *Bacillus subtilis* (Gómez-Marín *et al.*, 2009; Qazi *et al.*, 2013), por lo que el crecimiento inicial de *T. harzianum* se puede asociar al uso de este nutriente como fuente de carbono, para luego comenzar la síntesis enzimática a partir de los componentes presentes en el bagazo de caña de azúcar.

4.2. Determinación de las actividades enzimáticas de las enzimas lignocelulolíticas presentes en el extracto enzimático

Las actividades enzimáticas obtenidas se presentan en el Cuadro 8, en el cual se observa que las actividades enzimáticas de las enzimas celulasas y lignocelulasas producidas a partir del bagazo de caña de azúcar pretratado biológicamente a 30°C presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 8. Actividades enzimáticas de las principales enzimas celulasas y lignocelulasas totales presentes en el extracto enzimático. Los resultados son presentados \pm DS. Las letras diferentes en los superíndices representan diferencias significativas. Por tratamiento se realizó un experimento y tres repeticiones.

| Sustrato | Enzima | Bagazo pretratado | Actividad enzimática (U/ml) |
|----------------------|----------------------|-------------------|--------------------------------|
| Carboximetilcelulosa | Endoglucanasa | Control | 0.521 \pm 0.031 ^c |
| | | 26°C | 0.648 \pm 0.026 ^c |
| | | 28°C | 0.631 \pm 0.034 ^c |
| | | 30°C | 1.726 \pm 0.030 ^d |
| | | 32°C | 0.502 \pm 0.022 ^c |
| Avicel | Exoglucanasa | Control | 0.255 \pm 0.030 ^e |
| | | 26°C | 0.317 \pm 0.034 ^e |
| | | 28°C | 0.309 \pm 0.046 ^e |
| | | 30°C | 0.844 \pm 0.012 ^f |
| | | 32°C | 0.295 \pm 0.011 ^e |
| Celobiosa | β -glucosidasa | Control | 0.237 \pm 0.023 ^g |
| | | 26°C | 0.296 \pm 0.011 ^g |
| | | 28°C | 0.288 \pm 0.024 ^g |
| | | 30°C | 0.788 \pm 0.014 ^h |
| | | 32°C | 0.275 \pm 0.006 ^g |
| Papel filtro | Celulasa total | Control | 0.008 \pm 0.002 ⁱ |
| | | 26°C | 0.009 \pm 0.001 ⁱ |
| | | 28°C | 0.009 \pm 0.003 ⁱ |
| | | 30°C | 0.175 \pm 0.002 ^j |
| | | 32°C | 0.009 \pm 0.003 ⁱ |
| Bagazo de caña | Lignocelulasas | Control | 1.326 \pm 0.023 ^k |
| | | 26°C | 1.169 \pm 0.047 ^k |
| | | 28°C | 1.087 \pm 0.502 ^k |
| | | 30°C | 0.010 \pm 0.004 ^l |
| | | 32°C | 1.155 \pm 0.020 ^k |

Esto indica que al someter el bagazo de caña de azúcar a un pretratamiento biológico por *P. ostreatus* en cultivo en fase líquida a 30°C, el proteoma producido por *T. harzianum* cultivado en placa a partir de dicho bagazo pretratado posee elevada actividad celulolítica. Sin embargo, desfavorece la actividad lignocelulolítica.

Para determinar la actividad celulolítica de los microorganismos se evalúa la actividad endoglucanasa (EG), exoglucanasa o celobiohidrolasas (CBH), y β -glucosidasa (BGL), por ser las enzimas que participan en la degradación de la celulosa (Bhat, 2000; Moya, 2011; Gupta *et al.*, 2012; Juturu & Wu, 2014). Pero, es necesario tener en cuenta que estos ensayos no predicen completamente la eficiencia de las celulasas durante la bioconversión de materiales lignocelulósicos, ya que no existe una clara relación entre la actividad sobre sustratos solubles con los insolubles (Singhania *et al.*, 2010). Por lo tanto, se debe tener en cuenta que la naturaleza del sustrato afecta el comportamiento de las enzimas al estar en contacto con ella, tal cual lo menciona Abo-State *et al.* (2010), las celulasas producidas a partir de residuos agroindustriales presentaron alta actividad celulolítica en el siguiente orden paja de trigo > salvado de trigo > paja de arroz > tusa de maíz. Esto sustenta los resultados obtenidos en este trabajo ya que se observó mayores actividades celulasas en los sustratos solubles (CMC, Avicel, Celobiosa) que en los insolubles (papel filtro, bagazo de caña).

Rodríguez & Piñeros (2007), sugirieron que *Trichoderma sp.* no crece de forma apropiada sobre residuos de palma pretratados químicamente o posiblemente se limita su crecimiento por la presencia de restos derivados del proceso químico. Así también Manjarrés *et al.* (2011), reportaron que el tiempo y tipo de tratamiento influyen en forma significativa sobre las actividades enzimáticas. Por otro lado, Florencio *et al.* (2015) mencionaron que un cultivo en estado sólido y el uso de bagazo de caña de azúcar pretratado como sustrato están directamente relacionados con un aumento de la actividad enzimática. Estas consideraciones sustentan los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación.

Así también, se han realizado investigaciones para evaluar la actividad enzimática de celulasas comerciales, Salcedo *et al.* (2011) reportó en su estudio que la actividad de enzimas celulasas comerciales sobre residuos de la cosecha de cañas de azúcar presentaron una actividad de 27.53 FPU/ml, la alta actividad celulasa total se justifica en que las celulasas comerciales experimentan procesos de purificación y de concentrado. Por otro lado, Delabona *et al.* (2012) utilizaron un complejo enzimático producido por *T. harzianum* P49P11 a 30°C para hidrolizar el bagazo de caña de azúcar pretratado con el cual obtuvieron enzimas con una actividad celulasa total de 0.78 U/ml.

Berlin *et al.* (2005) reportaron que la deslignificación del bagazo de caña de azúcar mejora los rendimientos durante la hidrólisis de la celulosa. También Gautam *et al.* (2011) confirmó que la fermentación en estado sólido proporciona una mayor actividad enzimática y las menores posibilidades de contaminación bacteriana. Estos antecedentes soportan nuestros resultados ya que al utilizar el bagazo de caña de azúcar pretratado a 30°C durante 14 días como sustrato para la producción de celulasas por *T. harzianum*, en el cual la celulosa quedó más expuesta se obtuvo la mayor producción celulasas.

Las actividades endoglucanasas obtenidas en el presente trabajo de investigación fueron superiores en un 84 y 33% respectivamente a las actividades reportadas por Ahmed *et al.* (2009) y Florencio *et al.* (2015) quienes también cultivaron *T. harzianum* sobre residuos lignocelulósicos los cuales no fueron pretratados biológicamente. Sin embargo, las actividades endoglucanasas obtenidas fueron inferiores a las actividades endoglucanasas reportadas por, de Castro *et al.* (2010), Rocha *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2016) ya que solo representaron su 27, 6 y 15% respectivamente. Ellos utilizaron *T. harzianum* como productor de celulasas y bagazo de caña de azúcar parcialmente deslignificado como sustrato. Sin embargo, desarrollaron metodologías diferentes, de Castro *et al.* (2010) agregaron enzimas xilanasas, Rocha *et al.* (2016) suministraron la proteína swolenina para mejorar la hidrólisis del sustrato. Finalmente, Zhang *et al.* (2016) utilizaron técnicas de ingeniería genética mediante la expresión de una proteína artificial la cual potenció la producción de celulasas.

4.3. Determinación de las actividades específicas de las enzimas lignocelulolíticas presentes en el extracto enzimático

Las actividades específicas obtenidas se presentan en el Cuadro 9, en el cual se observa que las actividades específicas de las enzimas celulasas y lignocelulasas producidas a partir del bagazo de caña de azúcar pretratado biológicamente a 30°C presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 9. Actividades específicas de las principales enzimas celulasas y lignocelulasas totales presentes en el extracto enzimático. Los resultados son presentados \pm DS. Las letras diferentes en los superíndices representan diferencias significativas. Por tratamiento se realizó un experimento y tres repeticiones.

| Enzima | Bagazo pretratado | Actividad específica (U/mg) |
|------------------------|-------------------|--------------------------------|
| Endoglucanasa | Control | 1.048 \pm 0.024 ^m |
| | 26°C | 1.463 \pm 0.017 ^m |
| | 28°C | 1.507 \pm 0.014 ^m |
| | 30°C | 5.734 \pm 0.040 ⁿ |
| | 32°C | 1.138 \pm 0.027 ^m |
| Exoglucanasa | Control | 0.513 \pm 0.035 ^o |
| | 26°C | 0.716 \pm 0.038 ^o |
| | 28°C | 0.737 \pm 0.033 ^o |
| | 30°C | 2.804 \pm 0.037 ^p |
| | 32°C | 0.668 \pm 0.046 ^o |
| β -glucosidasa | Control | 0.477 \pm 0.046 ^q |
| | 26°C | 0.596 \pm 0.044 ^q |
| | 28°C | 0.579 \pm 0.041 ^q |
| | 30°C | 1.586 \pm 0.027 ^r |
| | 32°C | 0.553 \pm 0.005 ^q |
| Celulasa total | Control | 0.015 \pm 0.022 ^s |
| | 26°C | 0.021 \pm 0.033 ^s |
| | 28°C | 0.022 \pm 0.016 ^s |
| | 30°C | 0.581 \pm 0.001 ^t |
| | 32°C | 0.020 \pm 0.038 ^s |
| Lignocelulasas totales | Control | 2.667 \pm 0.046 ^u |
| | 26°C | 2.639 \pm 0.023 ^u |
| | 28°C | 2.594 \pm 0.054 ^u |
| | 30°C | 0.034 \pm 0.026 ^w |
| | 32°C | 2.620 \pm 0.016 ^u |

Los resultados obtenidos sugieren que al someter el bagazo de caña de azúcar a un pretratamiento biológico por *P. ostreatus* en cultivo en fase líquida a 30°C, el proteoma producido por *T. harzianum* en cultivo en fase sólida a partir de dicho bagazo pretratado posee mayor actividad específica celulolítica. Sin embargo, desfavorece la actividad específica lignocelulolítica.

Existe evidencia en la literatura de que la presencia de xilanasas mejora el rendimiento de las celulasas esto se debe a que la escisión de la hemicelulosa mejora el acceso de las celulasas a la celulosa y que el género *Trichoderma* posee actividad lignolítica y xilanolítica (Rocha *et al.*, 2016). Una evaluación del efecto de la suplementación de xilanasas a celulasas mostró que la liberación de glucosa aumentó casi linealmente con la eliminación de xilosa por las xilanasas de la mazorca de maíz (Kumar & Wyman, 2009). Esta información sustenta la menor actividad lignolítica del extracto enzimático obtenido a partir del bagazo pretratado biológicamente a 30°C el cual indujo a la producción de celulasas por poseer la celulosa más expuesta mientras que en los demás tratamientos se presume mayor presencia de enzimas lignolíticas.

T. reesei cultivado en un medio con celulosa o biomasa lignocelulósica como sustrato, secreta una mezcla enzimática compleja compuesta principalmente por celulasas y hemicelulasas (Saloheimo & Pakula, 2012). Este secretoma contiene numerosas endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, sin embargo, su β -glucosidasas, es muy bajo (Saloheimo & Pakula, 2012). Según Gusakov (2011), las exoglucanasas son las más abundante (más del 75%) en el secretoma de *T. reesei*. Sin embargo, nuestros resultados sugieren la predominancia de endoglucanasas y también un bajo porcentaje de enzimas β -glucosidasas en el secretoma de *T. harzianum* cultivado en bagazo de caña de azúcar pretratado biológicamente a 30°C por *P. ostreatus* en cultivo en fase líquida.

V. CONCLUSIONES

1. La actividad enzimática celulasa total y actividad celulasa específica total del secretoma proteico sintetizado por *Trichoderma harzianum* a partir del bagazo de caña de azúcar pretratado en fermentación sumergida a 30°C por *Pleurotus ostreatus* fueron 21.8 y 38.7 veces superiores a las obtenidas del secretoma proteico sintetizado por *T. harzianum* a partir del bagazo de caña de azúcar no pretratado.
2. El secretoma proteico sintetizado por *T. harzianum* a partir del bagazo de caña de azúcar no pretratado por *P. ostreatus* reportó 132.6 veces superior la actividad lignocelulasa total y 78.4 veces superior la actividad específica lignocelulasa total comparado con el secretoma proteico sintetizado por *T. harzianum* a partir del bagazo de caña de azúcar pretratado a 30°C en fermentación sumergida.
3. El secretoma proteico de *T. harzianum* cultivado en placa con bagazo de caña de azúcar pretratado por *P. ostreatus* en fermentación sumergida a 30°C, fue el 60% del secretoma proteico de *T. harzianum* sintetizado a partir del bagazo de caña de azúcar no pretratado.

VI. RECOMENDACIONES

1. Caracterizar el secretoma de *Trichoderma harzianum* cultivado sobre bagazo de caña de azúcar pretratado biológicamente por *Pleurotus ostreatus* en cultivo en fase líquida a 30°C.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aachmann, F. L., Sorlie, M., Skjak-Braek, G., Eijsink, V. G. H., & Vaaje-Kolstad, G. (2012). NMR structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(46), 18779–18784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208822109>
- Abo-State, M. A. M., Hammad, A. I., Swelim, M., & Gannam, R. B. (2010). Enhanced production of cellulase by *Spergillus* spp. isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci*, *8*(4), 402–410.
- Adav, S. S., Chao, L. T., & Sze, S. K. (2012). Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Molecular & Cellular Proteomics*, *11*(7), 1–15. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.012419>
- Aguilar-Rivera, N. (2011). Efecto del almacenamiento de bagazo de caña en las propiedades físicas de celulosa grado papel. *Ingeniería Investigación Y Tecnología*, *XII*(1), 189–197.
- Ahmed, S., Bashir, A., Saleem, H., Saadia, M., & Jamil, A. (2009). Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pak. J. Bot*, *41*(3), 1411–1419.
- Aline, J., De Abreu, S., Da, A. F., Roviada, S., & Pamphile, J. A. (2015). Fungos de interesse: Aplicações biotecnológicas fungi of interest. *Revista UNINGÁ Review*, *21*(1), 55–59. Retrieved from <http://www.mastereditora.com.br/review>
- Andrade, M. F., & Colodette, J. L. (2014). Dissolving pulp production from sugar cane bagasse. *Industrial Crops and Products*, *52*, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.041>
- Atkinson B, Mavituna F. (1991). Biochemical engineering and biotechnology handbook. New York, Stockton Press, 1991:224-226.
- Aucatoma, B., Castillo, R., Mendoza, J., & Garcés, F. (2015). Factores que afectan la calidad de la caña de azúcar. *Centro de Investigación de La Caña de Azúcar Del Ecuador-CINCAE.*, *1*, 9. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1398.1528>
- Baldrian, P., & Gabriel, J. (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, *206*(1), 69–74. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00519-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00519-5)
- Bardales, C. B., Rojas, C. M., & León, C. A. (2015). Evaluación de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales del departamento de La Libertad , Perú como potenciales materias primas para la obtención de bioetanol. *Arnaldoa*, *22*(1), 225–232.
- Barnett, J., & Jeronimidis, G. (2003). Wood quality and its biological basis. *Biological Sciences Series*, 240.

- Basanta, R., García, M., Cervantes, J., Mata, H., & Bustos, G. (2007). Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 293–305.
- Bayer, E. A., Shimon, L. J. W., Shoham, Y., & Lamed, R. (1998). Cellulosomes: Structure and ultrastructure. *Journal of Structural Biology*, 124, 221–234. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4065>
- Becerra, A. P., Buitrago, A. L., & Pinto, P. (2016). Sostenibilidad del aprovechamiento del bagazo de caña de azúcar en el Valle del Cauca, Colombia. *Ingeniería Solidaria*, 12(20), 133–149. Retrieved from <http://www.banrepcultural.org/revista-18>
- Becker, H. . G., & Sinitsyn, A. P. (1993). Mn-peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: The action on the lignin. *Biotechnology Letters*, 15(3), 289–294.
- Behera, S. S., & Ray, R. C. (2016). Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 656–669. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>
- Benoliel, B., Torres, F. A., Benoliel, B., Araripe, F., Torres, G., Maria, L., & Moraes, P. De. (2013). A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura, (DECEMBER). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-656>
- Berlin, A., Gilkes, N., Kilburn, D., Bura, R., Markov, A., Skomarovsky, A., ... Saddler, J. (2005). Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates – evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.039>
- Berman, J. (2011). Desarrollo de alimento animal melazado y enriquecido a partir de insumos no convencionales y subproductos de la caña de azúcar, para engordar ganado bovino en etapa de finalización. *Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.*, 120. Retrieved from [http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/843/Tesis Final Ladrilleros.pdf?sequence=1](http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/843/Tesis%20Final%20Ladrilleros.pdf?sequence=1)
- Betta, K. (2014). Evaluación de la actividad de la enzima lisosomal beta - galactosidasa en muestras de fibroblastos lisados dispuestos sobre papel filtro. Tesis de maestría. Santiago: Universidad de Chile.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 355–383. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cadoche, L., & López, G. D. (1989). Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biological Wastes*, 30(2), 153–157. [https://doi.org/10.1016/0269-7483\(89\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0269-7483(89)90069-4)

- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa. <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org
- Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A., & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería Y Ciencia - Ing.cienc.*, 8(16), 307–335. Retrieved from <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/ingciencia/article/view/1716>
- Castanera, R., Pérez, G., Omarini, A., Alfaro, M., Pisabarro, A. G., Faraco, V., ... Ramírez, L. (2012). Transcriptional and enzymatic profiling of pleurotus ostreatus laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4037–4045. <https://doi.org/10.1128/AEM.07880-11>
- Chávez, M., & Domine, M. (2013). *Lignin, structure and applications: Depolymerization methods for obtaining aromatic derivatives of industrial interest*. *Avances en Ciencias e Ingeniería* (Vol. 4). Retrieved from http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/2013/Vol4/Nro4/3-ACI1184-13-full.pdf
- Chen, S., Zhang, X., Singh, D., Yu, H., & Yang, X. (2010). Biological pretreatment of lignocellulosics: potential, progress and challenges. *Biofuels*, 1(1), 177–199. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.13>
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus Pleurotus. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 582–594. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0930-y>
- Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>
- de Arriaga, D., Soler, J., Busto, F., & Cadenas, E. (1978). Cinética enzimática: Manejo de datos. In *Universidad de Oviedo* (p. 273).
- de Castro, A. M., Ferreira, M. C., da Cruz, J. C., Pedro, K. C. N. R., Carvalho, D. F., Leite, S. G. F., & Pereira, N. (2010). High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. *Enzyme Research*, 2010(ii), 1–8. <https://doi.org/10.4061/2010/854526>
- de la Macorra, C. (2004). Tratamiento de impregnación con álcali y peróxido de hidrógeno para reducir el consumo energético en la producción de pastas mecánicas: Modificaciones estructurales de la molécula de lignina. *Tesis de Doctorado*. *Universidad Complutense de Madrid*, 307. <https://doi.org/ISBN:978-84-693-1123-3>
- Delabona, S., Sanchez, C., Ribeiro, M., Freitas, S., & Geraldo, J. (2012). Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technology*, 107, 517–521. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.048>
- del Prado, M. (2009). Biorrefinerías: Situación actual y perspectivas de futuro. *Genoma*

España, 150. Retrieved from <http://books.google.fr/books?id=apajXwAACAAJ>

- Delmer, D. P., & Haigler, C. H. (2002). The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. *Metabolic Engineering*, 4(1), 22–28. <https://doi.org/10.1006/mben.2001.0206>
- Devlin, T.(2004). Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. Hahnermann university. Philadelphia-Estados Unidos de América. ISBN 8429172084.1216 pp.
- Díaz, R. (2009). Efecto del pH inicial de desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida sobre su actividad lacasas. *Tesis de Maestría. Centro De Investigación En Biotecnología Aplicada.*, 108.
- Dutta, R. (2008). *Fundamentals of biochemical engineering. Biochemistry* (1st ed., Vol. Second). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77901-8>
- El-Bakry, M., Abraham, J., Cerda, A., Barrena, R., Ponsá, S., Gea, T., & Sanchez, A. (2015). From wastes to high value added products: Novel aspects of SSF in the production of enzymes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(18), 1999–2042. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1010423>
- Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (2009). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-21>
- Ezziyyani, M., & Sánchez, C. P. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*, (26), 35–45. <https://doi.org/10.1177/088391103039019>
- Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202007000100001>
- Florencio, C., Cunha, F. M., Badino, A. C., & Farinas, C. S. (2015). Validation of a novel sequential cultivation method for the production of enzymatic cocktails from *Trichoderma* strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(3), 1389–1402. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1357-5>
- Fonseca, E. B., Oviedo, A. M., & Vargas, I. J. (2006). Hidrólisis ácida de sustratos residuales agroindustriales colombianos. *Umbral Científico*, (8), 5–11.
- Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Revista Fitosanidad*, 14(3), 189–195.
- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology Research International*, 9. <https://doi.org/10.4061/2011/810425>
- Guarnizo, a., Martínez, P. N., & Sánchez, H. a. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación . biomass and cellulose pretreatments for saccharification. *Scientia et Technica*, 15(42), 284–289.
- Guillén, G. K., Márquez, F. J., & Sanchez, J. (1998). Producción de biomasa y enzimas

- ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev Iberoam Micol*, 15, 302–306.
- Gupta, P., Samant, K., & Sahu, A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/578925>
- Gusakov, A. V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2014). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Hansen, G. H., Lübeck, M., Frisvad, J. C., Lübeck, P. S., & Andersen, B. (2015). Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50(9), 1327–1341. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>
- Hatakka, A. I. (1983). Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 350–357. <https://doi.org/10.1007/BF00504744>
- Haza, A. I. (1995). Obtención de anticuerpos monoclonales frente a las caseínas de la leche de cabra y su utilización en la diferenciación de mezclas lácteas y quesos. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Heldt, H.W. (1997). Plant biochemistry and molecular biology. Oxford university press, Oxford – Ney York- Tokyo. ISBN 0 19 850180 3. 522 pp., GBP 65.00.
- Herrero, L., Ávila, R., Corrales, E., & Hun, L. (2004). Procedimientos en virología médica. *Universidad de Costa Rica*, 142.
- Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., & Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, 39(11), 1415–1419. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00267-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00267-X)
- Howard, R., Abotsi, E., Jansen, E., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 602–619. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1115>
- Ibarz, A., Barbosa, G., Garza, S., Gimeno, V.(2000). Métodos experimentales en la ingeniería alimentaria. Editorial Acribia. Zaragoza-españa. ISBN 84-200-0903-2.283pp.
- Ikeda, T., Holtman, K., Kadla, J., Chang, H.-M., & Jameel, H. (2002). Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 129–135.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>

- Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T., & Kuwahara, M. (2004). Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(3), 287–294. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1543-9>
- Kang, S., Xiao, L., Meng, L., Zhang, X., & Sun, R. (2012). Isolation and structural characterization of lignin from cotton stalk treated in an ammonia hydrothermal system. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 15209–15226. <https://doi.org/10.3390/ijms131115209>
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, U., & Wagenknecht, W. (1998). General considerations on structure and reactivity of cellulose. *Comprehensive Cellulose Chemistry*, 1, 9–29. <https://doi.org/10.1002/3527601929.ch2a>
- Kudlicka, K., & Brown, R. M. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 65(1–2), 17–24. <https://doi.org/10.5586/asbp.1996.003>
- Kumar, R., & Wyman, C. E. (2009). Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 100(18), 4203–4213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.057>
- Liu, L., Lin, Z., Zheng, T., Lin, L., Zheng, C., Lin, Z., ... Wang, Z. (2009). Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 426–433. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.02.008>
- López-Belmonte, T. (1996). *Estudio de la actividad y enantioselectividad de derivados de la lipasa de Rhizomucor miehei*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, 265- 275.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H. Van, & Isak, S. P. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506>
- Maeda, R. N., Serpa, V. I., Rocha, V. A. L., Mesquita, R. A. A., Anna, L. M. M. S., De Castro, A. M. H., ... Polikarpov, I. (2011). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, 46(5), 1196–1201. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.022>
- Manavalan, T., Manavalan, A., & Heese, K. (2014). Characterization of lignocellulolytic enzymes from white rot fungi. *Current Microbiology*, 70(4), 485–498. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0743-0>
- Manjarrés, K., Piñeros, Y., & Rodríguez-Sandoval, E. (2011). Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*, 23(1), 19–26.

- Margarita, Z.-D. C. L., Osney, P.-O., Antonio, R.-R. P., María, Z.-D. C. B., & Geraldo, L. (2015). Potencialidades del bagazo para la obtención de etanol frente a la generación de electricidad. *Ingeniería, Investigación Y Tecnología*, 16(3), 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.riit.2015.05.001>
- Martínez, C., Balcázar, E., Dantán, E., & Folch, J. (2008). Celulasas fúngicas : Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50, 119–131.
- Martinez, E. A., Villarreal, M. L. M., Almeida e Silva, J. B., Solenzal, A. I. N., Canilha, L., & Mussatto, S. I. (2002). Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *Ciencia Y Tecnología Alimentaria*, 3(5), 295–301. <https://doi.org/10.1080/11358120209487742>
- McCann, M., & Carpita, N. (2008). Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 314–320. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2008.04.001>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- MINAGRI. (2017). Producción de caña de azúcar en el Perú, perspectivas. *Dirección General de Políticas Agrarias*, 5, 7.
- Moya, L. A. (2011). Determinación de la capacidad celulolítica in vitro de consorcios de hongos provenientes de suelo del bosque alto andino y tusa de palma de aceite (*Eleaeis guinensis* Jacq) en descomposición sobre dos sustratos: Tusa y celulosa microcristalina. In *Tesis de maestría* (p. 89).
- Muñoz, L. (2012). Evaluación de enzimas degradadoras de lignina producidas por aislamientos fúngicos de cultivos de arroz. *Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana.*, 50.
- Nagoor, A., Arbain, D., Jamal, P., & Gumba, R. (2015). Improvement of halophilic cellulase production from locally isolated fungal strain. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.021>
- Nigam, P., & Singh, D. (1994). Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *Journal of Basic Microbiology*, 34(6), 405–423. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620340607>
- Oliva, J. M. (2003). Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. In *Tesis de doctorado* (p. 160).
- Pandey, A., Negi, S., & Soccol, C. R. (2017). *Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63664-5.00001-0>
- Paredes, D., Álvarez, M., & Silva, M. (2010). Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23(1), 81–88.

- Parenti, A., Muguerza, E., Redin, A., Omarini, A., Conde, E., Alfaro, M., ... Pisabarro, A. G. (2013). Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. *Bioresource Technology*, *133*, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.072>
- Quiroz-Castañeda, R. E., & Folch-Mallol, J. L. (2011). Plant Cell wall degrading and remodeling proteins: Current perspectives. *Proteínas Que Remodelan Y Degradan La Pared Celular Vegetal: Perspectivas Actuales*, *28*(4), 194–215. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84857675707&partnerID=40&md5=73d6562cf1dc2d9692617f429d9150c5>
- RAMOS, I. (1999). Producción de *Pleurotus ostreatus* var *florida* sobre residuales de cacao. *Trabajo de Maestría. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, 109.
- Rana, S., & Kaur, M. (2012). Isolation and screening of Cellulase producing microorganisms from degraded wood. *IJPBSF International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences Fundamentals*, *2*(1), 10–15.
- Rezende, M. I., Barbosa, A., Dalverto, A. F., & Endo, A. S. (2002). Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Microbiology*, *33*(1), 67–72. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v33n1/11095.pdf>
- Robinson, T., & Nigam, P. (2003). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2–3), 197–203. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00132-8)
- Rocha, V. A. L., Maeda, R. N., Pereira, N., Kern, M. F., Elias, L., Simister, R., ... Mcqueen-Mason, S. J. (2016). Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. *Biotechnology Progress*, *32*(2), 327–336. <https://doi.org/10.1002/btpr.2217>
- Rodríguez, I., & Piñeros, Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cocultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, *14*(2), 35–42.
- Rodríguez, P. A., Lombardi, G., Ometto, A., Zumalacarregui, L. M., & Perez, O. (2010). Potencialidades de generación de electricidad a partir de biomasa. *Scientia Et Technica*, *16*(45), 267–271.
- Romero-Arenas, O., Huerta, L. M., Huato, D. A. M., Hernández, F. D., & Victoria, A. D. A. (2009). The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *11*(2), 143–151.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *30*(5), 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Salcedo, J., López, J., & Flórez, L. (2011). Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha de caña de azúcar. *Dyna*, *78*(169), 182–190.
- Saloheimo, M., & Pakula, T. M. (2012). The cargo and the transport system : secreted

- proteins and protein secretion in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Microbiology*, 158, 46–57. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053132-0>
- Sánchez, A., Esqueda, M., Gaitán-Hernández, R., Córdova, A., & Coronado, M. L. (2008). Uso potencial del rastrojo de tomate como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp. *Revista Mexicana de Micología*, 28, 17–24. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Sarkar, S., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (1997). Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1339, 23–30.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S., & Rao, M. A. (2013). Production of cellulase – A review. *Ijpcbs*, 3(4), 1070–1090.
- Silva, A. J. da, Gómez-Mendoza, D. P., Junqueira, M., Domont, G. B., Ximenes Ferreira Filho, E., de Sousa, M. V., & Ricart, C. A. O. (2012). Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. *Proteomics*, 12(17), 2729–2738. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200048>
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2015). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Singhania, R. R., Sukumaran, R. K., Patel, A. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(7), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Šnajdr, J., & Baldrian, P. (2007). Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *Folia Microbiologica*, 52(5), 498–502. <https://doi.org/10.1007/BF02932110>
- Suárez, G. A. (2012). Plan de manejo de residuos en la industria azucarera caso de estudio: Ingenio Adolfo López Mateos, Oaxaca. *Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México*, 190. Retrieved from <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/5123/tesis.pdf?sequence=1>
- Subramaniam, R., & Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances : a Comparative Study. *International Journal of Science and Nature*, 3(3), 480–486.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : A review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Sutherland, G. R. J., & Aust, S. D. (1996). The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332(1), 128–134. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/abbi.1996.0324>

- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). *Current developments in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal* (Vol. 81). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Torres, M. (2009). Obtención de enzimas hidrolíticas a partir de una cepa del hongo *Aspergillus ficuum* mediante fermentación en medio sólido. *Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile*, 111.
- Tunga, R., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering*, 19, 187–190.
- Vilches, L. (2002). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaráz. *Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*, 77.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. de J., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)
- Viñals-Verde, Mabel, Bell-García, Antonio, Michelena-Álvarez, Georgina, Ramil-Mesa, M. (2012). Pretratamiento de la biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. *Sistema de Información Científica*, 46(1), 7–16. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223123848002.pdf>
- Widiastuti, H., Suharyanto, Wulaningtyas, & Sutamihardja. (2008). Activity of ligninolytic enzymes during growth and fruiting body development of white rot fungi *Omphalina* sp. and *Pleurotus ostreatus*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 15(4), 140–144. <https://doi.org/10.4308/hjb.15.4.140>
- Wing, R., & Alvarado, G. (2009). Valor nutricional del heno de transvala inoculado con el hongo *Pleurotus ostreatus* sp. *Agronomía Costarricense*, 33(1), 147–153.
- Yang, S. S., & Yuan, S. S. (1990). Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid state fermentation of sweet potato residue. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 6(3), 236–244. <https://doi.org/10.1007/BF01201291>
- Yates, J. R. (2000). Mass spectrometry from genomics to proteomics. *Outlook*, 16(1), 5–8. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01879-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01879-X)
- Zhang, C., Gong, F., & Li, D. (1995). A note on the utilisation of spent mushroom composts in animal feeds. *Bioresource Technology*, 52(6), 89–91. <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.2011.03.019>
- Zhang, F., Bai, F., & Zhao, X. (2016). Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* Rut-C30 by engineering with an artificial zinc finger protein library. *Biotechnology Journal*, 1–28. <https://doi.org/10.1002/biot.201600227>. Submitted

ANEXOS

ANEXO 1: Reactivos

1.1. Buffer citrato 0,05 M pH 5.4 (para 1 L)

Se pesa 1.96 g de ácido cítrico monohidratado y luego se disuelve en un poco de H₂O destilada, luego se adiciona 11.96 g de citrato de sodio dihidratado, finalmente se disuelve y se afora a 1 L con H₂O destilada (Torres, 2009).

1.2. Solución madre de glucosa al 0.2 %

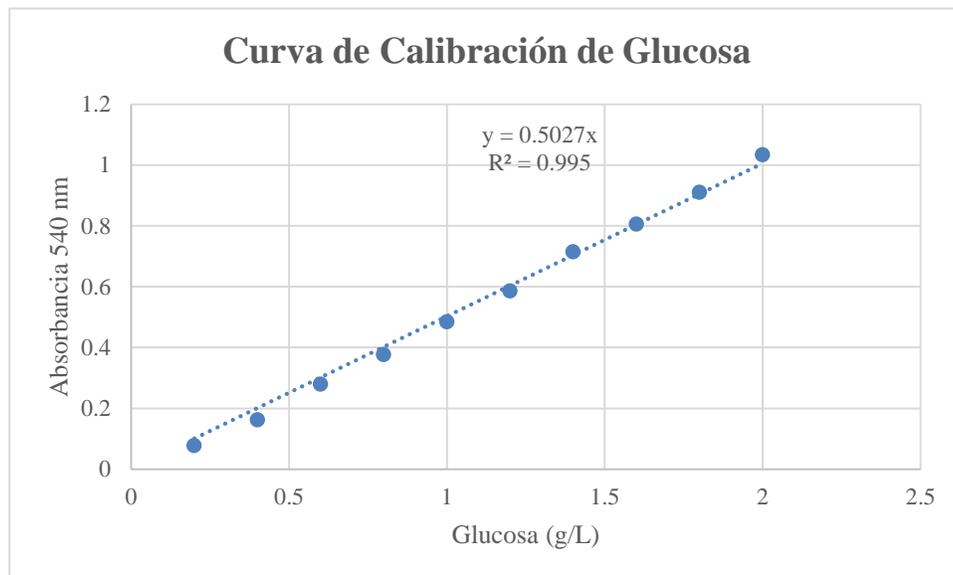
Pesar 0.1 g de glucosa y disolver en 50 ml de agua destilada.

ANEXO 2: Curvas de calibración (Protocolos)

2.1. Curva de Calibración de Glucosa (Método de DNS)

1. Preparar una solución de 2 g/L de glucosa.
2. Preparar diluciones de 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2 g/L.
3. Realizar la determinación de azúcares reductores mediante DNS: hervir por 5 minutos, se dejará enfriar en un recipiente con agua helada por 5 minutos, se agregará agua y se medirá la absorbancia a 540 nm.
4. Elaborar una gráfica relacionando las absorbancias con las concentraciones y determinar el rango lineal.
5. Realizar una regresión lineal de los datos del ítem anterior, determinar la ecuación de la recta y el coeficiente de regresión.

| Glucosa (g/L) | Absorbancia |
|---------------|-------------|
| 0.2 | 0.078 |
| 0.4 | 0.163 |
| 0.6 | 0.28 |
| 0.8 | 0.377 |
| 1 | 0.485 |
| 1.2 | 0.587 |
| 1.4 | 0.715 |
| 1.6 | 0.807 |
| 1.8 | 0.911 |
| 2 | 1.035 |



2.2. Curva de Calibración de BSA

Se utilizó albúmina del suero bovino (BSA) a concentración estándar de 200 ug/ml con el cual se realizó el siguiente procedimiento (Bradford, 1976).

| Reactivos | Batería de Tubos, volumen en uL | | | | | |
|----------------|---------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Tubo Control | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 |
| BSA 400 ug/ml | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| Agua Destilada | 150 | 120 | 90 | 60 | 30 | 0 |
| Concentración | 0 | 80 | 160 | 240 | 320 | 400 |
| Absorbancia | | | | | | |

Agregar 1.5 ml de reactivo de Bradford
 Agitar suavemente y dejar reposar por 10 min
 Leer a 595 nm

| Concentración (ug/ml) | Absorbancia |
|-----------------------|-------------|
| 0 | 0 |
| 80 | 0,055 |
| 160 | 0,101 |
| 240 | 0,14 |
| 320 | 0,18 |
| 400 | 0,215 |

